RTS074

Influenza A/B Q - PCR Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O kit **Influenza A/B Q-PCR Alert AmpliPROBE** é parte de um ensaio de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção diferencial de cDNA do vírus da Influenza A e do vírus da Influenza B no produto da reação de transcrição reversa obtido de RNA extraído de swabs nasais, swabs faríngeos, gargarejo ou sobrenadante de culturas celulares.

O produto deve ser usado, com dados clínicos e outros testes laboratoriais, no diagnóstico das infecções por vírus da Influenza A e por vírus da Influenza B.

O produto fornece 48 determinações para o cDNA de influenza A e 48 determinações para cDNA de Influenza B, incluindo controles.

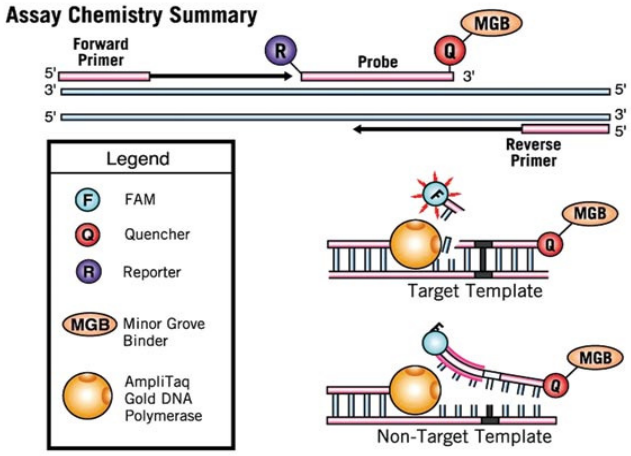
PRINCÍPIO DE AÇÃO E REAÇÃO

O procedimento envolve para cada amostra uma reação de amplificação em Tempo Real para o vírus Influenza A e uma reação de amplificação em tempo real para o vírus Influenza B. As duas reações produzidas em uma microplaca com um termociclador em tempo real.

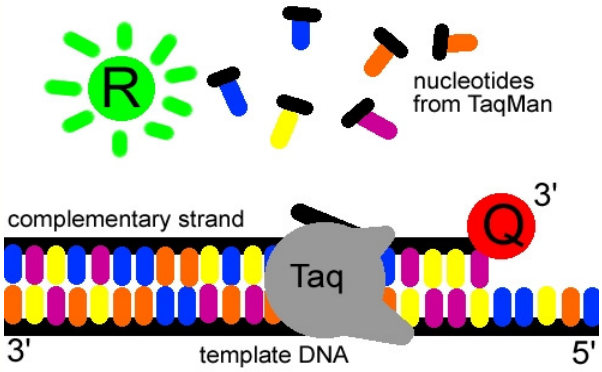
No primeiro poço, uma reação de amplificação é realizada para uma região do gene da matriz do vírus da Influenza A e para a região do RNA genômico do fago MS2 (teste interno de adequação), usando o cDNA produzido na reação de transcrição reversa das amostras. A sonda especifica para o vírus Influenza A, marcada com o fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para o vírus Influenza A. A sonda específica para o controle interno, marcada com fluoróforo VIC, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para controle interno. A emissão de fluorescência aumenta à medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta e é medido e gravado pelo aparelho.

No segundo poço, uma reação de amplificação é realizada para uma região do gene da matriz do vírus da Influenza B e para a região do RNA genômico do fago MS2 (teste interno de adequação), usando o cDNA produzido na reação de transcrição reversa das amostras. A sonda especifica para o vírus Influenza B, marcada com o fluoróforo FAM, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para o vírus Influenza B. A sonda específica para o controle interno, marcada com fluoróforo VIC, é ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para controle interno. A emissão de fluorescência aumenta à medida que o produto específico da reação de amplificação aumenta e é medido e gravado pelo aparelho.

O processamento dos dados determina a presença de cDNA dos virus de Influenza A ou Influenza B na amostra inicial.



A partir do momento que a sonda TaqMan® for ligada à parte específica do gabarito de DNA depois da desnaturação (alta temperatura) e resfriamento da reação, os primers se anelam ao DNA. A TaqPolimerase, então, adiciona nucleotídeos e remove a sonda TaqMan® do DNA gabarito. Isso separa o quencher do repórter e permite ao repórter emitir sua energia. Isso é, então, quantificado usando um computador. Quanto mais ocorrer a desnaturação e anelamento, mais oportunidades a TaqMan® terá de se ligar e, em contra partida, mais luz emitida será detectada.



O corante do repórter é liberado da dupla fita de DNA criada pela Taq Polimerase. Longe do corante quencher, a luz emitida do corante repórter em estado excitado pode, agora, ser observada.

A padronização do sistema foi realizado nos instrumentos da Applied Biosystems ABI PRISM série 7000.

COMPONENTES FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
Influenza A Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS074-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos (tampa VERMELHA)	2 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Influenza B Q-PCR Alert AmpliMIX - RTS074-M	Mistura de primers de oligonucleotídeos (tampa AMARELA)	2 x 110 µL	Oligonucleotídeos, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Influenza A Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS074-P	Mistura de sondas fluorescentes marcadas com FAM e com VIC (tampa VERMELHA)	2 x 110 µL	Oligonucleotídeos fluorescentes, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Influenza B Q-PCR Alert AmpliPROBE - RTS074-P	Mistura de sondas fluorescentes marcadas com FAM e com VIC (tampa AMARELA)	2 x 110 µL	Oligonucleotídeos fluorescentes, TRIS (base e cloridrato), Glicerol, Triton X-100
Q-PCR Alert AmpliMASTER - RTS000	Mistura de reagentes otimizados	4 x 340 µL	TRIS (base e cloridrato), Glicerol, $MgCl_2$, Desoriboxinucleotídeos trifosfatos, ROX, Uracil-N-glicosilase, Taq DNA polimerase hot start
	Microplaca com 96 pocinhos de 0,2 mL	3	Plástico PP
	Lâmina adesiva vedante	3	Plástico e cola

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Equipamentos:
- Capela de fluxo laminar
- Agitador tipo Vórtex
- Microcentrífuga de mesa (12.000 - 14.000 RPM)
- Micropipetas simples, volume variável
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com microcomputador

Material de Consumo:
- EPI
- Ponteiras com filtro
- Água ultrapura
- Tubos de microcentrifugação (1,5 mL a 2,0 mL)

Amostras:

- DNA extraído por metodologia definida pelo usuário, seguindo as normas e padrões de amostras exigidos na descrição abaixo.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Componente	Referência modelo	Quantidade	Estocagem
Infl A Q-PCR Alert AmpliMIX	RTS074-M	4 x 110 µL	-20°C
Infl B Q-PCR Alert AmpliPROBE	RTS074-P	4 x 110 µL	-20°C
Q-PCR Alert AmpliMASTER	RTS000	4 x 340 µL	+ 2°/+8°C
Microplaca para amplificação		3	Temp. Ambiente
Lâmina adesiva para amplificação		3	Temp. Ambiente

PRECAUÇÕES

Este kit é reservado para uso exclusivo em diagnóstico *in vitro*.

Manuseio: ao manusear o kit e as amostras, utilizar EPI adequado ao tipo de laboratório onde os testes serão realizados, devido à natureza da amostra – material biológico humano. Tratar como potencialmente infeccioso, por ser amostra de origem humana.

Não beber ou comer na área de trabalho.

A área de trabalho deve ser um ambiente limpo e com ventilação adequada. Trabalhar dentro de capela de exaustão / fluxo laminar.

Não manusear o kit sem luvas.

Advertências e precauções gerais

Manipular e eliminar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais usados como se fossem agentes infecciosos. Evitar o contato direto com as amostras biológicas. Evitar a formação de aerossol durante o procedimento – evitar respingar material ao redor da área de trabalho ou fora dela. O material que está em contato com as amostras biológicas deve ser tratado com Hipoclorito de sódio a 3 % pelo menos por 30 minutos ou ainda tratado em autoclave a 121°C durante uma hora antes de ser eliminado. O material descartável, se combustível, deve ser incinerado. Os resíduos líquidos que contêm ácidos ou bases devem ser neutralizados antes da eliminação.

Não pipetar nenhuma solução com a boca.

Lavar bem as mãos depois de haver manipulado as amostras e os reagentes.

Eliminar reagentes e resíduos conforme as normas vigentes.

Ler todas as instruções fornecidas no kit antes de realizar o teste.

Respeitar as instruções fornecidas no kit durante a execução do teste.

Respeitar a data de validade do kit.

Utilizar somente os reagentes presentes no kit e aqueles aconselhados pelo

fabricante.

Não intercambiar reagentes procedentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes procedentes de kits de outros fabricantes.

Advertências e precauções para a biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para evitar o risco de resultados incorretos, em particular por causa da degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou da contaminação das amostras por parte de produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular.

As amostras devem ser destinadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente para aquela área de trabalho. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções específicas para os componentes

Os tubos de teste contendo AmpliPROBE são descartáveis e, sendo assim, devem ser usados apenas uma vez na preparação da mistura de reação.

A AmpliPROBE possui os seguintes avisos de segurança (S):

S 23-25 Não aspirar gás/fumaça/vapor/aerossol. Evitar o contato com os olhos.

CUIDADOS COM A AMOSTRA BIOLÓGICA

Este produto deve ser usado com cDNA obtido do RNA extraído das seguintes amostras biológicas: swabs nasais, swabs faríngeos, gargarejo ou de sobrenadante de

culturas celulares.

Os swabs faríngeos e nasais destinados à extração de RNA devem ser preparados segundo a indicação do laboratório, diluídas em meio de transporte para culturas celulares ou solução fisiológica estéril ou PBS estéril, transportadas a +2°/+8°C e conservadas a +2°/+8°C por um máximo de quatro horas, em caso contrario devem ser congeladas e conservadas a -20°C por um máximo de trinta dias ou ainda a -70°C por períodos mais longos.

As amostras de gargarejo destinadas a extração de RNA devem ser preparadas segundo as indicações do laboratório em solução fisiológica estéril, transportado a +2°/ +8°C e conservadas a +2°/+8°C por um máximo de quatro horas, em caso contrario devem ser congeladas e conservadas a -20°C por um máximo de trinta dias ou ainda a -70°C por períodos mais longos.

As amostras de sobrenadante de cultura celular destinadas para extração do RNA devem ser conservadas a +2°/ +8°C por um máximo de quatro horas, em caso contrario devem ser congeladas e conservadas a -20°C por um máximo de trinta dias ou ainda a -70°C por períodos mais longos.

Recomenda-se subdividir em mais alíquotas as amostras para conservar congeladas de modo a não submetê-las a ciclos de congelamento/descongelamento repetidos.

Instruções para pré-tratamento das amostras clínicas, se aplicáveis, e para a extração de DNA estão no manual de instrução do EXTRAgen®.

Cuidados de armazenamento e transporte, visando à estabilidade da amostra:

As amostras de swabs nasais, swabs faríngeos, gargarejo ou sobrenadante de culturas celulares, que serão usadas para extração de DNA, devem ser colhidas de acordo com as direções do laboratório, em solução fisiológica estéril, transportadas a +2°/ +8°C e armazenadas a +2°/ +8°C por no máximo três dias.

As precauções com o manuseio e descarte da amostra:

A amostra deve ser tratada como potencialmente infecciosa.

Os fatores interferentes que contraindiquem o uso da amostra:

O cDNA deve ser obtido a partir do RNA que não contenha mucoproteínas para evitar fenômenos de inibição e a possibilidade de frequentes resultados não válidos.

Não há dados disponíveis pertinentes a inibição causada por drogas antivirais, antibióticos, quimioterápicos ou imunossupressores.

PROCESSO DE MEDIÇÃO

O Influenza A/B Q-PCR AlertPROBE deve ser usado com os produtos Q-PCR Alert AmpliMASTER e Influenza A/B Q-PCR Alert AmpliMIX para obter a mistura de reação.

A AmpliPROBE está pronta para uso, sendo assim deve ser adicionada diretamente à mistura de reação.

O procedimento completo envolve preparação e execução de amplificação em tempo real em dois poços diferentes de uma microplaca com um termociclador em tempo real e é descrito em detalhe no manual de instruções com o Influenza A/B Q-

PCR Alert AmpliMIX.

As características de desempenho e limitações do procedimento do ensaio completo para detecção e dosagem de cDNA dos vírus de Influenza A e Influenza B são descritos em detalhes no manual de instruções com o Influenza A/B Q-PCR Alert AmpliMIX.

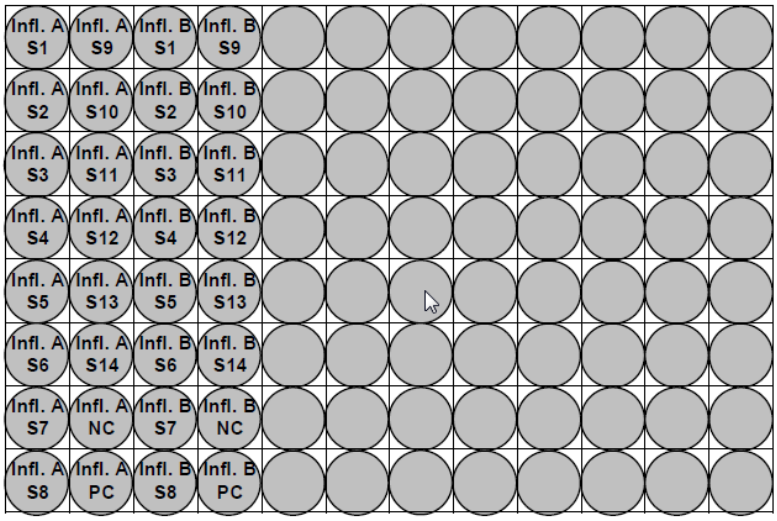
As técnicas de utilização dos reagentes e dos demais componentes do produto, descrevendo os volumes utilizados, os tempos requeridos em cada etapa ou fase, as condições ambientais, bem como os ajustes dos instrumentos de medição do produto, da técnica ou da reação:

Preparo da etapa de amplificação real time
(Realizado na área de amplificação/detecção dos produtos da amplificação)

Antes de iniciar a sessão é necessário:

- Consultando o manual do equipamento, ligar o termociclador para tempo real, ligar o computador de controle, iniciar o software e abrir a sessão "quantificação absoluta";
- Consultando o manual do equipamento, configurar o "detector" para a sonda para o vírus da Influenza A com o "repórter" como "FAM" e o "quencher" como "nenhum" (NFQ= Quencher não fluorescente) e chamá-lo de Inf. A;
- Configurar o "detector" para a sonda para o vírus da Influenza B com o "repórter" como "FAM" e o "quencher" como "nenhum" (NFQ= Quencher não fluorescente) e chamá-lo de Inf. B;
- Configurar o "detector" para a sonda a ser usada no controle interno com o "repórter" como "VIC" e o "quencher" como "nenhum" (NFQ= Quencher não fluorescente);
- Para cada poço usado na microplaca, configurar os "detectores" (tipo de fluorescência a serem medidas), a "referência passiva" como "ROX" (normalização da fluorescência medida), e o tipo da reação (amostra, Controle Positivo de amplificação, Controle Positivo de amplificação, padrão de quantidade conhecida). Adicionar estas informações à planilha adicionada no fim deste manual de instruções, ou imprimir a disposição da microplaca. A planilha deve ser seguida cuidadosamente durante a transferência da reação de mistura e amostras nos poços.

Ilustra-se a seguir, a título de exemplo, como pode ser organizada a análise de 14 amostras:



Legenda:
Inf A A1 - Inf A A14: Amostras para analisar;
Inf A CN: Controle Positivo de amplificação;
Inf A CP: Controle Positivo da amplificação
Inf B A1 - Inf A A14: Amostras para analisar;
Inf B CN: Controle Positivo de amplificação;
Inf B CP: Controle Positivo da amplificação

Consultando a documentação do equipamento, programar no termociclador os parâmetros do ciclo térmico indicando 45 ciclos e um volume de reação de 25 µL. Para equipamentos Applied Biosystems ABI PRISM™ da série 7000 escolher a opção "9600 emulation".

Ciclo térmico para amplificação		
Fase	**Temperaturas**	**Tempos**
Descontaminação	50°C	2 min.
Desnaturação inicial	95°C	10 min.
45 ciclos	95°C	15 seg.
	60°C	1 min.

Preparação da amplificação
(Realizado na área de extração/ preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar, é necessário:

- Retirar e descongelar os tubos contendo as amostras a serem analisadas. Centrifugar os tubos para que o material desça para o fundo do tubo e mantê-los em gelo;
- Retirar e descongelar os tubos de AmpliMIX Infl. A (tampa vermelha) e AmpliMIX Infl. B (tampa amarela) necessários para o processo, lembrando que o conteúdo de cada tubo é suficiente para preparar 24 reações. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que os reagentes desçam para o fundo e mantê-los em gelo;

- Retirar e descongelar um número igual de tubos de AmpliPROBE Infl. A (tampa vermelha) e AmpliPROBE Infl B (tampa amarela) e tubos de AmpliMIX. Repetir o pulso nesses tubos para que seu conteúdo desça para o fundo tubo. Mantê-los em gelo.
- Retirar o mesmo número de tubos de AmpliMASTER quantos os tubos de AmpliMIX. Infl. A, escrever "Infl. A" e a data no tubo com caneta de tinta permanente. Dar um pulso nos tubos para que os reagentes desçam para o fundo depois de descongelados. Mantê-los em gelo.
- Retirar o mesmo número de tubos de AmpliMASTER quantos os tubos de AmpliMIX. Infl. B, escrever "Infl. B" e a data no tubo com caneta de tinta permanente. Dar um pulso nos tubos para que os reagentes desçam para o fundo depois de descongelados. Mantê-los em gelo.
- Retirar e descongelar os tubos de Controle Positivo Infl. A e Controle Positivo Infl. B. Centrifugar os tubos para que os reagentes desçam para o fundo depois de descongelados. Mantê-los em gelo.
- Retirar a microplaca de amplificação que será usada na seção, com o cuidado de manipulá-la com luvas sem talco e de não causar danos aos poços.

1. Transferir 100 µL de AmpliMIX Infl. A (tampa vermelha) no tubo de AmpliMASTER rotulado "infl A". Misturar bem e pipetar três vezes o volume de 100 µL na mistura.
2. Transferir 100 µL de AmpliPROBE Infl. B. (tampa vermelha) no tubo de AmpliMASTER rotulado Infl A. Misturar bem e pipetar três vezes o volume de 100 µL na mistura.
3. Misturar em Vórtex, em baixa velocidade, por 5 segundos, evitando formação de espuma.
4. Centrifugar os tubos por 5 segundos (pulso) para que todo líquido vá para o fundo.
5. Repita o procedimento do 1 ao 4 adicionando o reagente AmpliMIX Infl B (tampa amarela) e o reagente AmpliPROBE Infl. B (tampa amarela) ao tubo de AmpliMASTER rotulado com Infl B.
6. Transferir 20 µL da mistura de reação "Infl A" obtida para o fundo de cada poço "Inf A" na placa de amplificação, conforme estabelecido na planilha (lembre-se que deve haver um poço para o Controle Positivo e um para o Controle Positivo).
7. Transferir 20 µL da mistura de reação "Infl B" obtida para o fundo de cada poço "Inf B" na placa de amplificação, conforme estabelecido na planilha (lembre-se que deve haver um poço para o Controle Positivo e um para o Controle Positivo).

NOTA: Caso não seja utilizada toda a mistura de reação, armazene no escuro a -20°C por no máximo um mês em um tubo rotulado como Infl A ou Infl B, conforme o caso. Congele e descongele a mistura de reação somente uma vez.

8. Transferir cuidadosamente 5 µL de cDNA da primeira amostra no poço "Infl. A" e 5 µL de cDNA da primeira amostra no poço "inf B", conforme posição definida na planilha elaborada. Prossiga da mesma forma para as demais amostras de cDNA.

9. Transferir, depositando cuidadosamente no fundo dos poços de Controle Positivo, 5 µL de água ultrapura.
10. Transferir, depositando-os cuidadosamente no fundo de seu respectivo poço, 5 µL Controle Positivo Inf A e 5 µL Controle Positivo Inf B, conforme posição definida na planilha elaborada.
11. Selar a Microplaca de amplificação com a Lâmina adesiva de amplificação.
12. Transferir a placa de amplificação para o termociclador de tempo real, que deve estar em área específica de amplificação/ detecção e inicie o ciclo de amplificação.

As informações sobre procedimentos adicionais relevantes para executar a medição e o tempo na qual ela pode ser realizada.

Não há outros procedimentos além dos acima mencionados.

CALIBRAÇÃO DO PROCESSO

Não é o caso, pois não existe procedimento de calibração para a metodologia em questão.

CÁLCULOS E OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Análise qualitativa dos resultados

Os valores de fluorescência, emitidos pela sonda específica para o vírus Influenza A (FAM "Infl. A" detector), pela sonda especifica para o vírus Influenza B (FAM "Infl. B" detector) e pela sonda especifica do controle interno (VIC "IC" detector) nas reações de amplificação devem ser analisadas pelo software do instrumento.

Antes da análise, consultar a documentação do instrumento e:

- Ajustar manualmente o intervalo de cálculo do nível de fundo de fluorescência (Baseline) do ciclo 6 ao ciclo 15;

***NOTA:** No caso de uma amostra positiva, com um alto título de vírus Influenza A ou Influenza B, a fluorescência FAM da sonda específica para RSV pode começar a crescer antes do 15º ciclo. Neste caso o intervalo de cálculo da "baseline" deve ser adaptado do ciclo 6 ao ciclo em que a fluorescência FAM começar a aumentar.

- Configurar manualmente o limiar da fluorescência (Threshold) para os detectores de "Infl A" e "Infl B" FAM para 0.2;
- Configurar manualmente o limiar da fluorescência (Threshold) VIC para 0.1

Os valores de fluorescência emitidos pelas sondas específicas na reação de amplificação e o valor Threshold permitem determinar o cT (ciclo Threshold), o ciclo em que a fluorescência atinge o valor Threshold.

Os valores cT das sondas específicas para os vírus de Influenza A e Influenza B

nas reações de amplificação “Infl A” e “Infl B” com controles positivos são usados para validar a amplificação e detecção como mostrado nas tabelas seguintes:

Reação Controle Positivo Infl. A (“Infl. A” FAM)	Resultado do teste	Amplificação / Detecção
cT ≤ 25	**POSITIVO**	**CORRETO**

Reação Controle Positivo Infl. B (“Infl. B” FAM)	Resultado do teste	Amplificação / Detecção
cT ≤ 25	**POSITIVO**	**CORRETO**

Se resultado da reação da amplificação do Controle Positivo for cT>25 ou indeterminado, isso significa que o DNA alvo não foi detectado corretamente. Um problema ocorreu durante a fase de amplificação ou detecção (volume das misturas de reação incorreto, degradação da sonda, degradação do Controle Positivo, dispensação incorreta do Controle Positivo, configuração incorreta da posição do Controle Positivo, configuração incorreta do ciclo térmico) o que pode ter levado a resultados falsos negativos. A sessão é inválida e deve ser repetida da fase de amplificação.

Os valores cT de uma sonda específica para Influenza A e Influenza B na reação de amplificação com controles negativos são usados para validar a amplificação e detecção como mostrado nas tabelas seguintes:

Reação Controle Positivo Infl. A (“Infl. A” FAM)	Resultado do teste	Amplificação / Detecção
cT Indeterminado	**NEGATIVO**	**CORRETO**

Reação Controle Positivo Infl. B (“Infl. B” FAM)	Resultado do teste	Amplificação / Detecção
cT Indeterminado	**NEGATIVO**	**CORRETO**

Se o resultado da reação de amplificação do Controle negativo é diferente de indeterminado, isso significa que o DNA alvo foi detectado. Problemas ocorreram durante a fase de amplificação (contaminação) os quais podem ter levado a resultados falsos positivos. A sessão é inválida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Os valores cT das sondas específicas para os vírus de Influenza A e Influenza B nas reações de amplificação de cada amostra são utilizados para detectar a presença do DNA alvo, enquanto os valores cT das sondas específicas para o controle interno são usados para validar a extração, transcrição reversa, amplificação e detecção.

Verificar no software do instrumento que o cT foi determinado por um rápido e regular crescimento dos valores de fluorescência e não por picos ou incremento de sinal background.

Este produto está apto a detectar uma quantidade mínima de 10 cópias de cDNA de vírus Influenza A, e 10 cópias de cDNA de vírus Influenza B por reação de amplificação, correspondentes a 10 cópias de Equivalentes de genomas por reação (Verificar dados sobre Características de Desempenho).

Os valores de cT para cada amostra são interpretados a fim de detectar os

vírus Influenza A e Influenza B, como mostrado na tabela seguinte:

Reação Amostra "infl A"		Adequação da amostra	Resultado do teste	cDNA de Influenza A
Vírus Influenza A (FAM)	Controle interno (VIC)			
cT Indeterminado	cT > 35 ou Indeterminado	inadequado	inválido	-
	cT ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETECTADO
cT Determinado	cT > 35 ou Indeterminado	adequado*	válido, positivo	PRESENTE
	cT ≤ 35	adequado	válido, positivo	PRESENTE
Reação Amostra "infl B"		**Adequação da amostra**	**Resultado do teste**	**cDNA de Influenza B**
Vírus Influenza B (FAM)	**Controle interno (VIC)**			
cT Indeterminado	cT> 35 ou Indeterminado	inadequado	inválido	-
	cT ≤ 35	adequado	válido, negativo	NÃO DETECTADO
cT Determinado	cT > 35 ou Indeterminado	adequado*	válido, positivo	PRESENTE
	cT ≤ 35	adequado	válido, positivo	PRESENTE

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é cT indeterminado para o cDNA de dos vírus de Influenza A ou Influenza B e cT > 35 ou indeterminado para o cDNA do controle interno, isso significa que não foi possível detectar suficientemente o cDNA do controle interno. Neste caso, problemas ocorreram na fase de amplificação (amplificação insuficiente ou nula) ou na fase de transcrição reversa (inválida ou ineficiente) ou na fase de extração (perda de DNA, presença de inibidores, degradação da amostra de DNA), o que podem ter levado a resultados falsos negativos. A amostra não é adequada, o teste é inválido e deve ser repetido a partir da extração de uma nova amostra.

Se o resultado da reação de amplificação de uma amostra é cT Indeterminado para o cDNA de vírus Influenza A ou Influenza B e cT ≤ 35 para o cDNA do controle interno, isso significa que o cDNA do vírus Influenza A ou Influenza B não foi detectado no cDNA extraído da amostra, mas não é possível descartar que a sua presença em titulação inferior ao limite de detecção do produto (veja dados em Características de Desempenho). Neste caso o resultado será um falso negativo.

Os resultados obtidos com este teste devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros testes de laboratório relativos ao paciente.

Obs.: Quando cDNA do vírus da Influenza A ou B é detectado na reação de amplificação da amostra a amplificação do Controle Interno pode resultar em cT > 35 ou indeterminado. De fato, a baixa eficiência da reação de amplificação do Controle

Interno pode ser ocasionada pela alta eficiência da reação de amplificação do cDNA do vírus da Influenza A ou B. Neste caso, a amostra é adequada e o resultado positivo do teste é válido.

Cálculo do Limite de Detecção

Quando um método particular de extração é usado, o limite de detecção deve ser calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Limite de detecção (gEq / ml)} = \frac{\text{Ve x Vp x 10 gEq}}{\text{Vc x Vt x Va x Ee x Et}}$$

- **Vc:** é a quantidade de amostra usada na extração em relação à unidade de medida requisitada.
- **Ee:** é a eficiência da extração, expressa em décimos.
- **Ve:** é o volume total do produto da extração, expresso em µL.
- **Va:** é o volume do produto da extração usado na reação de amplificação, expresso em µL.
- **Quantity:** é o resultado da reação de amplificação da amostra, expresso em gEq por reação.
- **Vc**: é o volume da amostra utilizada na extração; por exemplo, com EXTRAgen o parâmetro do Vc é de 0,3 mL.
- **Ee**: é a eficiência da extração; por exemplo, com EXTRAgen o parâmetro Ee é 0,8 (eficiência mínima de 80%).
- **Ve:** é o volume total da extração do produto; por exemplo, com EXTRAgen o parâmetro do Ve é de 15 µL.
- **Vt:** é o volume da extração do produto utilizado na transcrição reversa da reação; por exemplo, com o RT – Kit Plus o parâmetro é 10 µL.
- **Et:** é a eficiência da reação de transcrição reversa; por exemplo, com o RT – Kit Plus o parâmetro é 0,5 (eficiência de 50%).
- **Vp:** é o volume total da reação de transcrição reversa; por exemplo, com o RT – Kit Plus o parâmetro é 25 µL.
- **Va:** é o volume do produto de reação de transcrição reversa utilizado na reação de amplificação: o parâmetro Va para este produto é de 5 µL.

Quando o kit de extração EXTRAgen e o RT – Kit Plus é utilizado, o limite de detecção é:

Produto	Limite de detecção
EXTRAgen® RT – Kit plus	625 gEq / mL

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Use somente cDNA produzido pela transcrição reversa do RNA extraído das seguintes amostras humanas: swabs nasais, swabs faríngeos, gargarejo ou sobrenadante de cultivo celular.

Não utilizar com este produto o cDNA obtido pela transcrição reversa de RNA extraído de amostras contaminadas por mucoproteínas: mucoproteínas inibem a reação de amplificação de ácidos nucleicos e pode causar resultados inválidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenômenos de inibição por parte dos medicamentos antibióticos, antivirais, quimioterápicos ou imunossupressores.

Os resultados obtidos com este produto dependem da correta coleta, transporte, armazenamento e preparação das amostras; para evitar resultados incorretos, é necessário, portanto, ter particular atenção durante estas fases e seguir atentamente as instruções fornecidas com os produtos para a extração dos ácidos nucleicos.

Devido à sua alta sensibilidade analítica, o método de amplificação em tempo real dos ácidos nucleicos utilizados neste produto está sujeito à contaminação por amostras clínicas positivas para vírus Influenza A e Influenza B, controles positivos e, até mesmo, produtos da reação de amplificação. As contaminações levam a resultados falsos positivos. O produto foi desenvolvido de forma a limitar as contaminações; mesmo assim estes fenômenos podem ser evitados somente com uma boa prática de laboratório e seguindo escrupulosamente as instruções fornecidas nestas instruções.

Este produto requer pessoal instruído no processamento de amostras biológicas potencialmente infecciosas e preparações químicas classificadas como para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o usuário ou outras pessoas.

Este produto requer roupa de trabalho (EPI) e área de trabalho adequadas à manipulação de amostras biológicas potencialmente infecciosas e de reagentes classificados como perigosos, para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o usuário ou outras pessoas.

Este produto requer pessoal instruído para técnicas de biologia molecular como extração, amplificação e detecção de ácidos nucleicos, para evitar resultados incorretos.

É necessário possuir áreas separadas para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção de produtos de amplificação para prevenir resultados falsos positivos.

Este produto requer o uso de roupas de trabalho (EPI) e instrumentos destinados à extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que o cDNA de vírus Influenza A ou Influenza B não foi detectado no produto da transcrição reversa obtida do RNA extraído da amostra, mas a amostra pode conter cDNA de vírus Influenza A ou Influenza B a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto (veja capítulo Características de Desempenho), neste caso o resultado será um falso negativo.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, existe um risco latente de obter resultados não válidos, falsos positivos e falsos negativos com este produto. Este risco residual não pode ser eliminado ou reduzido. Em situações particulares

como diagnósticos de urgência, o risco residual pode contribuir a decisões incorretas com consequências graves para o paciente.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Controles de Amplificação

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação com reação de Controle Positivo e uma reação de Controle Positivo.

Para o Controle Positivo, utilize água bidestilada estéril (não fornecida com o produto) adicionada à reação no lugar do DNA extraído da amostra.

Para o Controle Positivo, utilize o produto Influenza A/B – Positive Control.

Controles de Qualidade

É recomendado validar todo o procedimento de análise para cada sessão de extração e amplificação pelo processamento de uma amostra negativa e uma positiva que já foram testadas, ou através de material de calibração de referência.

VALORES DE REFERÊNCIA OBTIDOS EM POPULAÇÕES SADIAS OU VALORES DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ESTATÍSTICOS, DESEJÁVEIS, TERAPÊUTICOS OU TÓXICOS

Não existe este tipo de dado para a metodologia em questão.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade Analítica: limite de detecção

A sensibilidade analítica deste teste permite identificar a presença de aproximadamente 10 moléculas de DNA alvo nos 5 µL de DNA extraído e acrescentado à reação de amplificação.

Em termos de limite de detecção, a sensibilidade analítica do ensaio foi testada usando um DNA plasmídico contendo o produto de amplificação de Influenza A, Influenza B e do fago MS2, cuja concentração inicial foi medida através de espectrofotômetro. O DNA plasmídico de Influenza A e Influenza B foram diluídos a uma titulação de 10 cópias / 5 µL em DNA contendo o produto de amplificação do fago MS2 a um título de 50.000 cópias / 5 µL. Esta amostra foi usada em 50 repetições para realizar a amplificação com produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Reação	Amostras	N	Positivos	Negativos
Infl. A	10 cópias DNA plasmídico Influenza A + 50.000 cópias de DNA plasmídico MS2	50	50	0
Infl. B	10 cópias DNA plasmídico Influenza B + 50.000 cópias de DNA plasmídico MS2	50	50	0

Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção e quantificação nos diferentes subtipos

A sensibilidade diagnóstica do teste, que é a eficiência de detecção e quantificação nos diversos subtipos, está avaliada por comparação de sequência com banco de dados de nucleotídeos.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do primer de oligonucleotídeos AmpliMIX Infl. A e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequência disponíveis no banco de dados da região do gene matriz do vírus Influenza A subtipos H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2, demonstrou preservação e ausência de mutações significativas.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do primer de oligonucleotídeos AmpliMIX Infl. B e da sonda fluorescente AmpliPROBE com as sequência disponíveis no banco de dados da região do gene matriz do vírus Influenza B cepas Victoria e Yamagata, demonstrou preservação e ausência de mutações significativas.

A sensibilidade diagnóstica do ensaio, que é a eficiência da detecção e quantificação de diferentes subtipos, foi avaliada pela análise de algumas amostras que eram positivas para RNA do vírus Influenza, 7 do tipo H1N1 e 7 do subtipo H3N2 ou do vírus da Influenza B das cepas Victoria e Yamagata.

A sensibilidade diagnóstica do ensaio foi avaliada usando o material de referência de amostras de swabs faríngeos positivos para RNA do vírus influenza A, 7 do subtipo H1N1 e 7 do subtipo H3N2, e amostras de tampões faríngeos positivos para o RNA do vírus Influenza B, 17 da cepa Victoria e 7 da cepa Yamagata, tipificados com um método de amplificação. Cada amostra foi usada para realizar o procedimento completo para análise (extração, transcrição reversa e amplificação) com os produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Reação	Amostras	N	Positivas	Negativas
Infl. A	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza A H1N1	7	7	0
Infl. A	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza A H3N2	13	13	0
Infl. B	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza B Victoria	17	16	0
Infl. B	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza B Yamagata	7	6	1

Uma amostra que era positiva para o vírus da Influenza B foi invalida e também foi inibida por outros ensaios de amplificação de ácidos nucleicos.

A amostra que foi negativa para Influenza B pode ser explicada por perda na titulação durante armazenamento.

Sensibilidade diagnóstica: amostras positivas

A sensibilidade diagnóstica do teste, confirmando amostras clínicas positivas, foi verificada analisando algumas amostras clínicas que eram positivas para RNA do vírus Influenza A ou Influenza B e foi maior que 95% para o vírus da Influenza A e

igual a 95.6%para o vírus da Influenza B.

A sensibilidade diagnóstica foi avaliada utilizando como material de referência 20 swabs faríngeos positivos para RNA do vírus Influenza A e 24 swabs faríngeos positivos para RNA do vírus Influenza B, testados usando um ensaio de amplificação em tempo real. Cada amostra foi empregada para realizar a todos os procedimentos de análise (extração, transcrição reversa e amplificação) com produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A. Os resultados são mostrados na tabela a seguir:

Reação	Amostras	N	Positivas	Negativas
Infl. A	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza A	20	20	0
Infl. B	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza B	24	22	1

Uma amostra que foi positiva para o vírus Influenza B foi invalida e também inibida por outros ensaios de amplificação de ácidos nucleicos.

A amostra que foi negativa para o vírus da Influenza B pode ser explicado por perda na titulação durante armazenamento.

Sensibilidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do ensaio, confirmado as amostras clínicas negativas, foi avaliada pela análise algumas amostras clínicas que eram negativas para RNA de Influenza A ou Influenza B e foi maior que 95% para os vírus Influenza A e Influenza B.

A especificidade diagnóstica foi avaliada usando como material de referência 23 amostras de swabs faríngeos que eram negativas para RNA de Influenza A e Influenza B, através de um ensaio de amplificação em tempo real. Cada amostra foi usada para realizar todo o procedimento de análise (extração, transcrição reversa e amplificação) com produtos da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais estão resumidos na tabela que segue abaixo:

Reação	Amostras	N	Positivas	Negativas
Infl. A	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza A	23	0	20
Infl. B	Swabs faríngeos positivos para o vírus da Influenza B	23	0	20

Três amostras negativas foram invalidas e também inibidas mesmo após extração de uma segunda alíquota e mesmo com outros ensaios de amplificação de ácidos nucleicos.

Especificidade analítica: marcadores interferentes em potencial

A especificidade analítica do teste, que é a reação cruzada com outros marcadores interferentes em potencial, foi avaliada pela comparação das sequencias com nucleotídeos do banco de dados.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do primer de oligonucleotídeos Infl. A AmpliMIX e da sonda fluorescente Infl. A AmpliPROBE com as sequências disponibilizadas no banco de dados de outros organismos que não o vírus de Influenza A, incluindo o vírus Influenza B, o vírus que mais se assemelha

com o vírus Influenza A, mostraram sua especificidade e a falta de homologia significativa.

O teste de alinhamento das regiões selecionadas para a hibridização do primer de oligonucleotídeos Infl. B AmpliMIX e da sonda fluorescente Infl. B AmpliPROBE com as sequência disponibilizadas no banco de dados de outros organismos que não o vírus de Influenza B, incluindo o vírus Influenza A, o vírus que mais se assemelha com o vírus Influenza B, mostrou sua especificidade e a falta de homologia significativa.

A especificidade analítica do ensaio, que é sua reatividade cruzada com outros marcadores interferentes potenciais, foi avaliada usando amostras clínicas positivas para ácidos nucleicos de outros patógenos.

A especificidade analítica do ensaio foi determinada utilizando, como material de referência, 30 amostras de swabs faríngeos negativos para RNA de vírus Influenza A, mas positivos para ácidos nucleicos de outros patógenos incluindo: 11 para o vírus da Influenza B, 13 para RSV, 1 para o vírus da Parainfluenza1, 1 para o vírus da Parainfluenza 2, 2 para o vírus da Parainfluenza 3, 1 para o vírus Parotitis e 1 para Adenovirus. Cada amostra foi usada para realizar o procedimento completo para análise (extração, transcrição reversa e amplificação) com produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados são referidos na tabela seguinte:

Reação	Amostras	N	Positivas	Negativas
Infl. A	Swabs faríngeos negativos para o vírus da Influenza A e positivos para outros patógenos	30	0	28

Duas amostras negativas foram inválidas e também foram inibidas com outros ensaios de amplificação de ácidos nucleicos.

A especificidade analítica do ensaio foi determinada utilizando, como material de referência, 32 amostras de swabs faríngeos negativos para RNA de vírus Influenza B, mas positivos para ácidos nucleicos de outros patógenos incluindo: 13 para vírus Influenza A, 13 para RSV, 1 para vírus Parainfluenza 1, 1 para vírus da Parainfluenza 2, 2 para vírus Parainfluenza 3, 1 para vírus Parotitis e 1 para Adenovirus. Cada amostra foi usada para realizar o procedimento completo para análise (extração, transcrição reversa e amplificação) com produtos Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados são referidos na tabela seguinte:

Reação	Amostras	N	Positivas	Negativas
Infl. B	Swabs faríngeos negativos para o vírus da Influenza B e positivos para outros patógenos	32	0	31

Uma amostra negativa foi invalida e também inibida por outros ensaios de amplificação de ácidos nucleicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHANG W., EVANS D.H. (1991) *J. Virol Methods* 33: 165-189

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490092

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:
24/12/2013

X

Mauricio Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

CTR074

Influenza A / B – Controle Positivo

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «**Influenza A/B – Controle Positivo** » é destinado ao uso como um controle positivo em ensaios qualitativos de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção do **cDNA do Vírus da Influenza A (Influenza A)** e do **cDNA do Vírus da Influenza B (Influenza B)** com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», « **Influenza A/B Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « **Influenza A/B Q - PCR Alert AmpliPROBE**» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O kit fornece os componentes:

Influenza A – Controle Positivo

Uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida dividida em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo de teste contém 65 µL de solução, suficiente para 12 sessões.

Os plasmídeos contêm uma região amplificada do gene matriz da **Influenza** A. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação confirma a habilidade de identificar a presença do cDNA do vírus **Influenza A**.

Influenza B – Controle Positivo

Uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida dividida em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo de teste contém 65 µL de solução, suficiente para 12 sessões.

Os plasmídeos contêm uma região amplificada do gene matriz da **Influenza B**. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação confirma a habilidade de identificar a presença do cDNA do vírus **Influenza B**.

O kit possibilita a execução de 12 reações para **Influenza A** e 12 reações para **Influenza B**, usando 5 µL por reação.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
Influenza A Controle Positivo	**Solução de plasmídeo**	**1 x 65µL**	**Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura**
Influenza B Controle Positivo	**Solução de plasmídeo**	**1 x 65 µL**	**Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura**

- Armazenar a -20°C ou inferior.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 – 14.000 RPM).
- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0.5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com computador.

ACESSÓRIOS

Os reagentes para a extração de RNA das amostras a serem analisadas e os reagentes otimizados para amplificação e detecção do DNA não estão inclusos neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «**EXTRAgen**» (EXTG01), kit para extração de ácidos nucleicos de amostras não celulares; total de 50 extrações.
- «**CPE-RNA - Controle Interno**» (CTRRNA/2), controle positivo de extração para RNA genômico de amostras não celulares, total de 50 extrações.
- «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**» (RTS000), combinação de reagentes otimizados, microplacas e adesivos para PCR em tempo real e determinação alélica; total de 96 reações.
- « **Influenza A/B Q - PCR Alert AmpliMIX**» (RTS074-M), primers oligonucleotídeos para PCR em tempo real; total de 48 reações.
- « **Influenza A/B Q - PCR Alert AmpliPROBE**» (RTS074-P), sondas fluorescentes para PCR em tempo real; total de 48 reações.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto é exclusivamente para uso *in vitro*.

Advertências e precauções gerais

Manusear e descartar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas. Evitar o contato direto com amostras biológicas. Evitar respingos. Os materiais que entram em contato com amostras biológicas devem ser tratados com hipoclorito de sódio 3% por, no mínimo, 30 minutos, ou autoclavados a 121°C por uma hora antes de serem descartados.

Manusear e descartar todos os reagentes e materiais como potencialmente infecciosos. Evitar contato direto com reagentes. Evitar respingos. Os resíduos devem ser tratados e descartados de acordo com normas de segurança. Resíduos líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do descarte.

Usar jaleco, luvas e óculos de proteção.

Nunca pipetar soluções com a boca.

Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho.

Lavar as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes.

Descartar as sobras de reagentes e resíduos de acordo com as normas de segurança.

Ler as instruções de uso antes de utilizar o produto. Seguir as instruções.

Não usar produtos após o prazo de validade estabelecido.

Somente usar os reagentes fornecidos no kit e aqueles recomendados pelo fabricante.

Não misturar reagentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes de outros fabricantes.

Advertências e precauções de biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal especializado para prevenir o risco de resultados incorretos, em particular devido à degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou devido à contaminação das amostras por produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular. Nunca transferir materiais da área de amplificação/detecção para a área de extração/preparação de reações.

As amostras devem ser empregadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse

e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente a este propósito. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções para componentes específicos

Os tubos contendo **Controle Positivo** podem ser congelados e descongelados por no máximo 12 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

O **Controle Positivo** apresenta as seguintes advertências (S):

S 23-25 Não inalar vapores. Evitar contato com os olhos.

PROCEDIMENTO

O produto « **Influenza A/B - Controle Positivo** » deve ser usado com a mistura de reação obtida com os produtos «**Q - PCR Alert AmpliMASTER**», « **Influenza A/B Q - PCR Alert AmpliMIX**» e « **Influenza A/B Q - PCR Alert AmpliPROBE**».

O **Controle Positivo Influenza A e o Controle Positivo Influenza B** estão prontos para o uso, portanto devem ser usados adicionando 5µL diretamente na mistura de reação.

O procedimento completo envolve preparação e execução de reação de amplificação com termociclador com sistema óptico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso do produto « **Influenza A/B Q - PCR Alert AmpliMIX**», bem como informações sobre as características de desempenho e limitações do procedimento.

NOTA: Os **Controles Positivos** podem ser congelados e descongelados por no máximo 12 vezes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHANG W., EVANS D.H. (1991) *J. Virol Methods* 33: 165-189

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490093

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

24/12/2013

X

Mauricio Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

WORKSHEET

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												

H												